

定量的標的プロテオミクスに基づく悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性変動因子の解明

著者	小淵 航
号	47
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博第505号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121640

論文内容要旨

(題目) 定量的標的プロテオミクスに基づく悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性変動因子の解明

(氏名) 小渕 航

【研究背景・目的】

悪性腫瘍は日本において死亡者総数の 28% を占め死因順位の第一位である疾患となっている(厚生労働省平成 24 年人口動態統計)。悪性腫瘍に対する治療法としては主に外科的手術による腫瘍摘出、放射線治療、化学療法が挙げられるが、悪性腫瘍が進行しており遠隔転移または周囲の組織への浸潤が認められる場合は外科的手術や放射線治療に加え化学療法が非常に重要となっている。近年、悪性腫瘍に対する化学療法は従来の細胞傷害性抗癌剤に加え分子標的薬に代表されるように腫瘍の分子レベルに基づく治療方針に大きく変化し、個別化治療の重要性が高まりつつある。しかし、現在の化学療法の障壁として抗癌剤に対する獲得耐性や自然耐性などが原因で抗癌剤薬効の低下が認められる患者が存在し、抗癌剤感受性の個人差が化学療法の問題となっている。従って、抗癌剤感受性の変動に関与する因子を明らかにすることは個別化治療を行う上で重要な課題である。

抗癌剤感受性の変動に関与し得る分子として、分子標的薬を含む抗癌剤の腫瘍細胞内濃度に関与するトランスポーター、および分子標的薬の直接の標的分子である増殖因子受容体等が挙げられる。これらの分子は多数存在するため、個別解析ではなく包括的な発現解析を行い、多数の分子の中から抗癌剤感受性の変動に主に関与する因子を同定することが重要である。網羅性に富む発現解析法として mRNA 等を対象とした手法が存在するが、mRNA 発現は機能の実体ではなく、mRNA 発現はタンパク質発現量と必ずしも相関しないことが報告されているため、機能を直接反映するタンパク質レベルでの解析を行うことは重要である。近年、液体クロマトグラフィー接続型質量分析装置(LC-MS/MS)を用いたタンパク質定量法である定量的標的プロテオミクスによって、複数のタンパク質の同時絶対定量が可能になった。従って本研究では、最終的には悪性腫瘍に対する個別化治療を実現するために、定量的標的プロテオミクスの手法を用いることで悪性腫瘍における抗癌剤感受性の変動に関与するタンパク質を明らかにすることを目的とした。

【方法】

本研究では、悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性変動に関与する因子を同定するために、異な

る性質を有する 3 種類の試料(悪性腫瘍培養細胞株、ヒト悪性腫瘍組織検体、悪性腫瘍 xenograft)を解析サンプルとして用いた。培養細胞株および組織検体から調製した細胞膜画分のトリプシン消化産物における複数膜タンパク質絶対発現量解析を LC-MS/MS を用いて行った。また、培養細胞株を用いた抗癌剤取り込み実験は培養細胞株に $[^3\text{H}]$ methotrexate や etoposide を 37°C で一定時間取り込ませ、細胞内放射活性の測定または LC-MS/MS を用いた測定を行った。なお、本研究は各研究実施施設の倫理委員会承認のもと行った。

【結果・考察】

胃癌および乳癌細胞株を用いた抗癌剤感受性個人差に關与する因子の解明

定量的標的プロテオミクスを用い、11 種類のヒト *in vitro* 悪性腫瘍細胞株(胃癌細胞株 6 種および乳癌細胞株 5 種)における 90 種類の膜タンパク質の同時絶対定量を行った。結果、胃癌細胞株では多剤排出トランスポーターである MRP1 (Multidrug resistance protein 1)発現量と etoposide 感受性($|\log_{10}\text{GI}_{50}|$)との間に負の相関性($r=-0.99$)が認められた。なお、抗癌剤に対する感受性を示す値である $|\log_{10}\text{GI}_{50}|$ は報告値から引用した(Nakatsu N *et al.*, *Mol Cancer Ther.*, 2005)。また、MRP1 阻害剤である MK571 を etoposide と併用して MRP1 が発現している胃癌細胞株に処理することで、定常状態における etoposide の細胞内蓄積量が増加し、etoposide に対する感受性が増加した。従って、胃癌細胞株では MRP1 の高発現による etoposide の細胞内蓄積量の低下が etoposide 耐性に關与することが示唆された。一方、乳癌細胞株では methotrexate (MTX)感受性株に対して 3400 倍 MTX 感受性($|\log_{10}\text{GI}_{50}|$)が低い耐性細胞株において MTX 取り込みトランスポーターである RFC1 (Reduced folate carrier 1)発現量が少なくとも 85%以上低下しており、MTX 感受性と RFC1 発現量との間に正の相関性($r=0.69$)が認められた。また、 $[^3\text{H}]$ MTX の初期取り込み速度および定常状態における細胞内蓄積量は RFC1 発現量および MTX 感受性とそれぞれ正の相関性($r=0.86$, $r=0.92$)を示した。従って、乳癌細胞株では RFC1 の低発現による MTX 細胞内蓄積量の低下が MTX 耐性に關与することが示唆された。このように、定量的標的プロテオミクスを用いることで、多数の膜タンパク質の中から薬剤感受性変動に主な關与を示す分子を同定することが可能であることが示唆され、本手法が本研究の目的を達成するために有用であることが認められた。

悪性脳腫瘍組織検体における膜タンパク質発現プロファイルの解明

個別化分子標的療法の臨床応用を実現するために、実際の臨床組織検体における膜タンパ

ク質の発現情報を得ることは不可欠である。従って、定量的標的プロテオミクスのヒト *in vivo* 組織への応用として、83 症例の悪性脳腫瘍組織(うち 58 症例が WHO grade IV である神経膠芽腫/GBM)を用いて膜タンパク質の発現解析を行った。その結果、分子標的治療のターゲット分子である EGFR, PDGFR α , β , ERBB2, c-kit など複数の増殖因子受容体の発現が認められた。特に、EGFR に関しては解析を行った GBM 組織検体のうち 86%の検体で発現が認められ、さらにその発現量差は検体間で 2400 倍以上と非常に個人差が大きいことが認められた。また、MDR1, MRP1, BCRP などの薬剤排出トランスポーターは非腫瘍脳組織検体と比較して高発現している傾向が認められ、抗癌剤の腫瘍細胞内濃度の低下に関与すると考えられた。従って、これら膜タンパク質発現の個人差が薬剤感受性の変動に関与する可能性があり、患者個人の膜タンパク質発現情報に基づく分子標的薬選択の重要性が示唆された。

悪性脳腫瘍 xenograft を用いた抗癌剤感受性個人差に関与する因子の解明

In vivo 組織を用いて膜タンパク質発現量が薬剤感受性変動の要因となるかを明らかにするため、ヒト GBM 組織検体から作製した GBM xenograft を用いた膜タンパク質の発現解析を行った。結果、ヒト悪性脳腫瘍組織検体において発現が認められた EGFR, PDGFR α , PDGFR β などの発現が GBM xenograft においても認められた。また、膜タンパク質発現量と抗癌剤感受性との比較解析を行った結果、EGFR の variant である EGFRvIII の EGFR 全体の発現量に対する発現割合が高く(31%以上)、かつ PTEN 発現が認められる検体では EGFR に対する分子標的薬である erlotinib に対する感受性が高くなることが認められ、EGFRvIII の発現割合が erlotinib 感受性変動の原因の一つであることが示唆された。また、GBM に対する標準治療薬である temozolomide に対して耐性である検体では、複数の膜タンパク質の発現解析を行うことで第二第三の治療方針を行うための分子標的療法のターゲット候補分子を複数選択することが可能であることが認められた。

しかし、一方で EGFRvIII の発現割合のみでは erlotinib 感受性を説明できない検体も一部認められたことから、EGFRvIII 発現以外の因子が erlotinib 感受性に関与していることが示唆された。EGFR は自己リン酸化をすることで下流のシグナル伝達系を活性化し細胞増殖シグナルを亢進させ、erlotinib は EGFR の自己リン酸化を阻害することで薬効を発揮する分子標的薬である。従って、複数の EGFR 自己リン酸化体(EGFRpY1172, EGFRpY1197)を LC-MS/MS を用いて直接同時に絶対定量する手法を確立し、GBM xenograft における erlotinib 感受性変動に EGFR 自己リン酸化体発現量が関与しているかを解析した。結果、*in vivo* 組織である GBM

xenograft において EGFR 自己リン酸化体の絶対定量が可能であることが認められ、EGFRvIII 発現割合のみでは一部説明ができなかった erlotinib 感受性に関しても、EGFR 全体の発現に対する EGFR 自己リン酸化体である EGFRpY1197 発現割合によって説明が可能となることが示唆された。

また、増殖因子受容体を起点とする腫瘍増殖シグナルには増殖因子受容体に加え受容体リガンドおよび細胞内シグナル伝達関連分子の発現に関しても考慮に入れる必要がある。従って、安定同位体元素標識タンパク質を作製することで分子標的薬感受性関連分子の一斉定量法を確立し、GBM xenograft におけるこれら分子の発現解析を行った。結果、PI3K/Akt 経路や MAPK 経路などの細胞内シグナル伝達関連分子の発現量と比較して増殖因子受容体発現量の個人差が大きいことが示唆された。また、EGFRpY1197 発現割合で erlotinib 感受性の説明が可能であることが示唆された検体に関して、増殖因子受容体である RET 発現の観点からも感受性を説明できる可能性が見出された。

【結論】

以上、本研究によって悪性腫瘍における抗癌剤感受性の変動の要因となり得る分子を複数同定した。また、ヒト臨床組織検体における膜タンパク質発現プロファイルを明らかにすることで分子標的療法のターゲット候補分子を同定することが可能になった点で意義が大きい。従って、本研究は悪性腫瘍に対する個別化治療の実現に向けた研究に大きな発展をもたらす成果であると考えられる。

【謝辞】

本研究に際して、悪性腫瘍培養細胞株を提供して下さいました公益財団法人がん研究会がん化学療法センター分子薬理部の矢守隆夫氏、ヒト悪性腫瘍組織検体を提供して下さいました金沢大学大学院医学系研究科 脳・脊髄機能制御学 濱田潤一郎教授および中田光俊講師、悪性腫瘍 xenograft を提供して下さいました米国 Mayo Clinic の Jann N. Sarkaria, M.D. に謹んで感謝致します。

論文提出者: 小渕 航

論文審査委員 (主査): 寺崎 哲也

論文題目: 定量的標的プロテオミクスに基づく悪性腫瘍に対する
抗癌剤感受性変動因子の解明

癌化学療法における個別化治療は重要な課題であり、抗癌剤感受性の個人差の原因を明らかにする必要がある。抗癌剤の標的はタンパク質であることから、本研究はタンパク質の定量解析に基づいて悪性腫瘍における抗癌剤感受性の変動因子を明らかにすることを目的とした。*In silico* 設計法を用いてタンパク質のトリプシン消化物の中から質量分析装置で高感度に検出可能な特異的配列ペプチドを選択し、安定同位体標識体を内部標準として用いた。三連四重極型質量分析装置を高速液体クロマトグラフィーに連結し **Selective Reaction Monitoring** モードでトリプシン消化サンプル中の標的ペプチドを同時定量した。解析対象として、培養癌細胞、悪性脳腫瘍手術摘出組織、**Xenograft** 継代癌組織を用いた。

抗癌剤感受性の異なる 11 種類のヒト *in vitro* 悪性腫瘍細胞株における 90 種類の膜タンパク質の同時定量を行い、発現量と薬剤感受性との比較解析を行った。胃癌細胞株では薬剤排出トランスポーターである **Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1)** 発現量と **Etoposide** 感受性との間に負の相関性($r=-0.99$)があり、胃癌細胞株では **MRP1** 高発現による **Etoposide** の細胞内蓄積量の低下が **Etoposide** 耐性に関与することが示唆された。一方、乳癌細胞株では薬剤取り込みトランスポーターである **Reduced Folate Carrier 1 (RFC1)** 発現量と **Methotrexate (MTX)** 感受性との間に正の相関性($r=0.69$)があり、乳癌細胞株では **RFC1** 低発現による **MTX** 細胞内蓄積量の低下が **MTX** 耐性に関与することが示唆された。

次に、臨床組織検体における膜タンパク質の発現を明らかにするため、83 症例の悪性脳腫瘍組織を用いて膜タンパク質の発現解析を行った。悪性脳腫瘍組織において複数の増殖因子受容体が発現しており、特に **Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)** に関しては 86% の検体で発現し、その発現量個人差は 2400 倍以上と非常に大きいことが示された。そこで、増殖因子受容体の発現量が薬剤感受性変動の要因となるかを明らかにするため、ヒト悪性脳腫瘍組織検体から作製した **xenograft** を用いて *in vivo* におけるタンパク質発現量と抗癌剤感受性との比較解析を行った。その結果、**EGFR** の変異体である **EGFRvIII** の **EGFR** 全体に対する発現割合が高く (31% 以上)、かつ **Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN)** が発現する検体では **EGFR** に対する分子標的薬である **Erlotinib** に対する感受性が高かった。さらに、**EGFR** の自己リン酸化体である **EGFRpY1172** または **EGFRpY1197** 発現割合が高い検体においても **Erlotinib** 感受性であった。

以上、本研究は悪性腫瘍に対するタンパク質の高感度同時定量的解析結果に基づいて、抗癌剤感受性の変動要因タンパク質を複数同定した。抗がん剤感受性タンパク質の質的・量的個人差は顕著であり、標的プロテオミクスに基づいた **Evidence Based Personalized Medicine** の重要性を示した研究として学術的に高く評価できる

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として合格と認める。